

170. 腎臓病における慢性炎症とカスパーゼ1の役割

長洲 一

川崎医科大学 腎臓・高血圧内科学

Key words : Inflammasome, 進行性腎障害, 線維化, 慢性炎症

緒言

慢性腎臓病は末期腎不全、透析導入へのリスクのみならず、心血管イベントのリスクであることが理解されて久しい。そのため慢性腎臓病治療対策が重要であるもののその病態解明は十分でない。多くの要因により腎機能障害は進行するが共通経路として慢性炎症が存在することがわかっており、その意義が示されてきた。一方で慢性炎症の機序は不明であり自然免疫のシステムである Inflammasome に着目し検討を行っている。現在プロジェクト進行中であり、一部を論文投稿中である。

方法および結果

まず我々は Inflammasome 活性化機序に関して検討を行った。着目したのは転写因子である Nrf2 (nuclear factor E2 p45-related factor 2) であり抗酸化遺伝子群のマスターレギュレーターである。Nrf 2 活性化は抗酸化作用及び抗炎症作用により腎保護的に働くことが想定されており創薬の一つのターゲットとなっている。一方で自然免疫応答のシステムである Inflammasome 活性化に必須のタンパクとしても知られておりその意義は不明であった。そこで「Nrf2 依存的 inflammasome 活性化が腎組織内炎症遷延及び線維化に重要である」という仮説のもと研究を行った。

炎症及び線維化を評価するため一側尿管結紮モデル (UUO) を用いて検討を行った。動物は C57B/6J (雄性、6-8 週齢) を使用した。最初に野生型 (WT) および *Nrf2* 遺伝子欠損マウス (*Nrf2* KO) に UUO を作製し、Day14 の組織を検討した。*Nrf2* KO-UUO では WT-UUO に比較し腎重量は保たれており、Masson 染色 および CollagenIV 染色で評価される線維化は抑制されていた。Masson 染色では継時的に (Day0, 3, 7, 14) 線維化の程度を評価しているが UUO 作製 Day3-7 では両群間に有意な変化は認めないものの、Day14 でその差は顕著であった (図 1)。

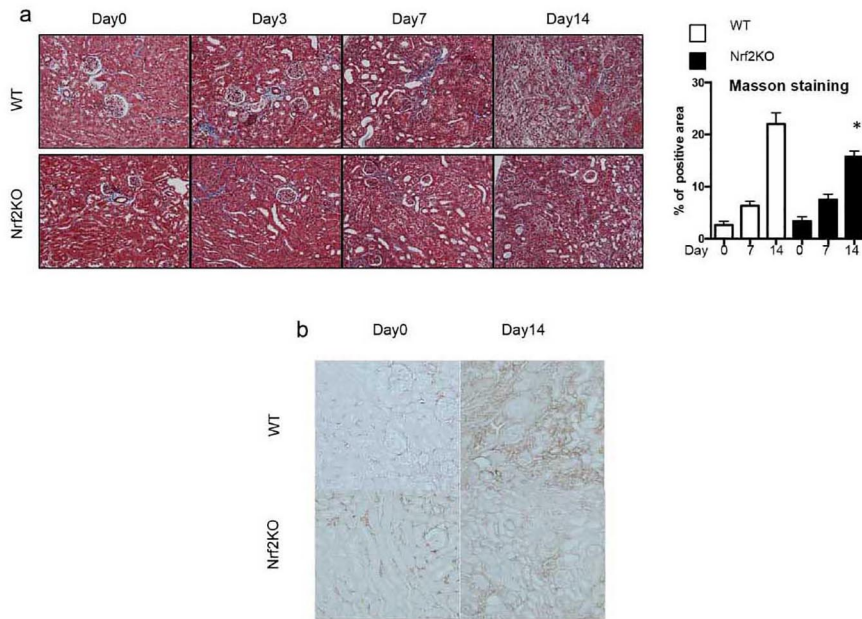


図1. *Nrf2* 遺伝子欠損マウスの腎組織線維化

a) Masson staining * $p < 0.05$ v.s. WT-UUO、Turkey-Kramer の一元配置分散分析法を用いて評価した。b) Collagen IV 染色。

また線維化関連遺伝子である CTGF、 α SMA の mRNA 発現を UUO-day14 で評価したところ、WT-UUO で WT-Sham に比較し有意に上昇したが、*Nrf2* KO-UUO は WT-UUO に比較しその上昇は有意に抑制されていた。 α SMA のタンパク発現量を WB で評価しているが、同様の傾向であった。炎症関連遺伝子に関しては MCP1 および ICAM を評価しているが、同様に WT-UUO では Sham に比較し mRNA 発現が上昇しているものの、その変化は *Nrf2* KO で有意に抑制されていた。IL1 β 蛋白発現を pro-IL1 β とともに検討したところ pro-IL1 β は UUO 作製により発現上昇を認めているが、WT-UUO と *Nrf2* KO-UUO では変化はなく IL1 β は WT-UUO に比較し *Nrf2* KO-UUO で有意に抑制されていた。これらのことから *Nrf2* はなんらかの機序で炎症拡大を抑制し、結果として線維化が軽減されていた。

UUO においては Inflammasome 活性化が炎症拡大と線維化に関与することが知られている¹⁾。そのため次に Inflammasome 活性化に着目し検討を続けた。Inflammasome 関連遺伝子として *TLR4*、*NLRP3*、*Caspase1*、*IL18* の mRNA 発現量を評価しているがこれらの遺伝子発現は *Nrf2* KO-UUO は WT-UUO に比較しその上昇は有意に抑制されていた。一方で F4/80 陽性細胞は軽度低下にとどまり、WB で確認したタンパク発現量と同様で有意な変化ではなかった。WT-UUO を継時的に評価すると Day3、Day7 で F4/80 蛋白発現量が増加していた。同時期に IL1 β および *Nrf2* 蛋白発現の上昇を認めた。同様に炎症関連遺伝子群 (*NLRP3* and *IL18*) も Day3、Day7 で上昇する一方で線維化関連遺伝子群 (*CTGF* and α *SMA*) は少し遅れて上昇する傾向にあった。これらの結果から F4/80 陽性細胞の浸潤自体には影響を与えずに炎症を抑制する可能性が示唆された。そこでマクロファージの詳細な検討を行うため FACS にて M1 マクロファージおよび M2 マクロファージの検討を行った。

WT-UUO-Day3 および WT-UUO-Day7 でのマクロファージの population を検討した。UUO-Day3 で CD11b 陽性-F4/80 low および CD11b 陽性-F4/80 high の細胞群が増加することがわかった。その後、UUO-Day7 では CD11b 陽性-F4/80 high の細胞群が増加していった。CD11b 陽性-F4/80 low、CD11b 陽性-F4/80 high それぞれを sorting し M1 marker である iNOS と M2 marker である CD206 の mRNA 発現を qPCR で評価したところ CD11b 陽性-F4/80 high では CD206 発現高値で M2 マクロファージであることが示された。同時に CD11b 陽性-F4/80 low では iNOS mRNA 発現が高値であり M1 マクロファージであった。以上のことから UUO 作製により早期の UUO-Day3 より M1 マクロファージが浸潤しており、M2 マクロファージはその後 UUO-Day7 から増加していくことがわかった。そこで、継時的な M1-M2 マクロファージの変化を WT および *Nrf2* KO で評価を行った。UUO-Day7 では両群間には変化はなく、

Nrf2 KO-UUO-Day14 では M1 population が WT-UUO-Day14 に比較して減少していた。この変化は *ASC* KO でも同様であった。また Day7 で M1 マクロファージと M2 マクロファージを sorting し、mRNA 発現を検討したところ、M1 における *IL1 β* および *Caspase1* の mRNA 発現が WT に比較し *Nrf2* KO においては抑制されていた (図2)。

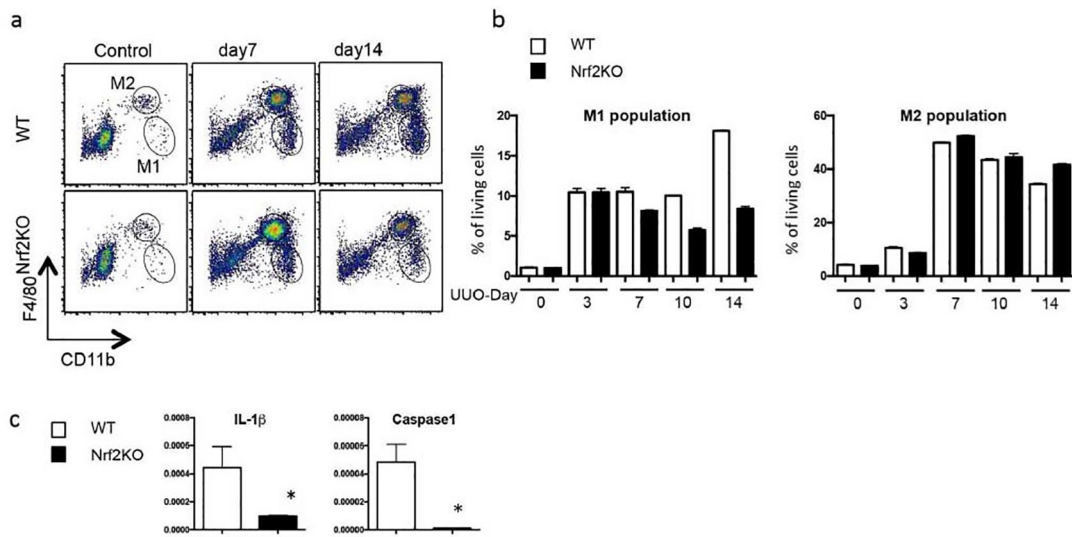


図2. M1 macrophage の浸潤評価

a) Y 軸 : F4/80 X 軸 : CD11b、b) living gate で抽出後のそれぞれの%を表記、c) WT 及び *Nrf2* KO のそれぞれの M1 分画を抽出後 mRNA level を評価。* $p < 0.05$ v.s. WT. Turkey-Kramer の一元配置分散分析法を用いて評価した。

次に WT に対して Caspase1 特異的阻害薬である VX765 を経口投与し Caspase1 活性化の継時的意義を検討した。later phase (Day7-14)、で投薬を行い M1 population 維持にどの時期の Inflammasome 活性化が重要かを FACS にて検討した。結果として later phase (UUO-Day7 以降) で Inflammasome 活性化を抑制することにより M1 population が減少することがわかった。以上の結果から M1 population の維持に Inflammasome 活性化が重要であり、特に early phase ではなく later phase でその意義が顕著であった。

次に、骨髄細胞由来細胞における *Nrf2* 活性化の意義を検討するため骨髄移植実験を行った。骨髄移植は WT、*Nrf2* KO、*ASC* KO の骨髄細胞をそれぞれ採取し WT へ移植を行い以下の3群を作製し検討した (WT-WT-BMT、*Nrf2* KO-WT、*ASC* KO-WT)。UUO 作製後、Day14 で評価している。Masson 染色で示されるように線維化は *Nrf2*-WT で有意に抑制されており、線維化関連遺伝子 (*α SMA*、*CTGF*) も WT-WT-UUO に比較し、*Nrf2* KO-WT-UUO では有意に抑制されていた。*ASC* KO-WT-UUO においても WT-WT-UUO と比較、同様の結果を確認しており、Inflammasome 活性化が線維化促進に働いていることがわかった。*Nrf2* と Inflammasome の関連を確認するため WT および *Nrf2* KO から骨髄由来マクロファージを採取し NLRP3 Inflammasome 活性化について検討を行った。NLRP3 Inflammasome 活性化を LPS-ATP で行い、活性化は上清中の *IL1 β* を ELISA で確認するとともに細胞内での cleaved Caspase1 および *IL1 β* の発現を WB で検討した。WT 由来 BMDM では LPS-ATP 刺激後の *IL1 β* 上清中への分泌と細胞内での活性型 Caspase-1 発現を認めた。しかし、*Nrf2* KO ではその活性化は限定的であった。しかし、*IL6* の発現は変化なく、直接的に Inflammasome 活性化へ影響を与えている可能性があった。

考 察

本研究から *Nrf2* の腎疾患病態進展における意義について大きく二つのことを解明することができた。一つはマクロファージにおける *Nrf2* 活性化が Inflammasome 活性化に必須であり、*Nrf2* 欠損マウスにおいては腎障害モデルにおける炎症の遷延化が抑制され線維化が軽減された。また、*Nrf2* 依存的 Inflammasome 活性化が病態形成において M1 population の維持に重要であり、結果として臓器炎症の慢性化に寄与している可能性が示唆された。治療介入意義に

関しては ATRA にて Nrf2 活性を抑制することで腎線維化を抑制することに成功した。これらの知見から Nrf2 およびそれに関与する Inflammasome 活性化は治療の新規 Target として重要である。

また UUO を含め腎疾患の進展における Inflammasome 活性化の意義はすでに報告されている。これらの事実から NLRP3-Inflammasome 活性化が腎疾患進展に寄与していることは疑いの余地がない。多くの研究から腎疾患進展時の Inflammasome 活性化機序、つまり上流となりうる経路が明らかにされている。我々自身もネフローゼモデルにおいて酸化アルブミンが尿細管におけるミトコンドリア障害をきたし Inflammasome 活性化をきたすことを報告している²⁾。また、高血圧モデルにおいては Aldosterone がマクロファージにおけるミトコンドリア障害を介して Inflammasome 活性化をきたす³⁾。しかし、これらの病態において Inflammasome 活性化がどのように腎疾患の進展に寄与しているかを示した報告はない。そこで我々は Macrophage の population について検討を行っている。我々のデータから UUO-Day3 で M1 が増加し Day7 ではすでに M2 が大部分を占めることがわかってきた。実際、Manabe らも同様の検討を行っており、比較的早い段階から M2 優位に変化することが示されている⁴⁾。しかし、一方で ASC KO の検討においても Day3 における M1 population は WT と比較し変化がなく初期の炎症細胞浸潤には寄与していない可能性が本研究からも示唆された。また、非常に興味深いことに Day7 以降の M1 population を継時的にみると WT ではほぼ変化がないが Nrf2 KO および ASC KO では著明に減少することがわかった。つまり、Nrf2 依存的 Inflammasome 活性化が M1 population の維持に関与している可能性が示唆された。

そのメカニズムに関しては不明ではあるが high-mobility group protein box1 (HMGB1) が M1 population の誘導へ関与しているとの報告があり^{5,6)}、HMGB1 が damage-associated molecular patterns (DAMPs) として働いた可能性がある。同時に Extracellular Histone も DAMPs として Inflammasome 活性化後に細胞外へ放出されることがわかっている⁷⁾。Inflammasome 活性化に伴う IL1 β などの Cytokine も重要ではあるが HMGB1 を含めた DAMPs が炎症拡大には極めて重要であることがわかっている⁸⁾。また、HMGB1 または Extracellular Histone は TLR4 signal を活性化するため⁹⁾、この作用がマクロファージの M1 への誘導に寄与しているかもしれない。このような In vivo で起こる悪循環が病態の慢性化の一因である可能性があり、Inflammasome 活性化を抑制することがその治療 Target となりうることを示された意義は大きい。

本研究から腎疾患病態形成において Nrf2 依存的に Inflammasome 活性化が重要であり、疾患の慢性化に寄与している可能性が示唆された。特に Inflammasome 活性化に伴い M1 分画が維持されたことが後の線維化を促す結果となった。

本研究結果より Nrf 2 依存的 Inflammasome 活性化が腎障害の進展に重要であり、特に M1 マクロファージ浸潤の遷延化に影響していた。この結果は今まで不明であった慢性腎臓病の病態、特に炎症の遷延化の一端を解明することに大きく寄与した。また同時に現在論文投稿中である。

現在、Inflammasome のコンポーネントである ASC-GFP を筋肉内にトランスフェクションし血中で ASC の検出に成功している。今後はこのように遠隔臓器におけるインフラマソーム活性化が腎臓に及ぼす影響について検討を行う。

共同研究者

本研究は川崎医科大学腎臓・高血圧内科学の柏原直樹、佐藤稔、城所研吾、東北大学医学系研究科医化学分野の山本雅之、自治医科大学炎症免疫研究部の高橋将文、信州大学分子腫瘍学講座の谷口俊一郎の協力のもと行った。

文 献

- 1) Vilaysane A, Chun J, Seamone ME, Wang W, Chin R, Hirota S, Li Y, Clark SA, Tschopp J, Trpkov K, Hemmelgarn BR, Beck PL, Muruve DA. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Oct;21(10):1732-44. PMID: 20688930 PMCID: PMC3013544 DOI: 10.1681/ASN.2010020143
- 2) Nishi Y, Satoh M, Nagasu H, Kadoya H, Ihoriya C, Kidokoro K, Sasaki T, Kashihara N. Selective estrogen receptor modulation attenuates proteinuria-induced renal tubular damage by modulating mitochondrial oxidative status. *Kidney Int*. 2013 Apr;83(4):662-73. PMID: 23344476 DOI: 10.1038/ki.2012.475
- 3) Kadoya H, Satoh M, Sasaki T, Taniguchi S, Takahashi M, Kashihara N. Excess aldosterone is a critical danger signal for inflammasome activation in the development of renal fibrosis in mice. *FASEB J*. 2015 Sep;29(9):3899-910. PMID: 26054366 DOI: 10.1096/fj.15-271734
- 4) Fujii K, Manabe I, Nagai R. Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice. *J Clin Invest*. 2011 Sep;121(9):3425-41. PMID: 21821915 PMCID: PMC3163964 DOI: 10.1172/JCI57582

- 5) Su Z, Zhang P, Yu Y, Lu H, Liu Y, Ni P, Su X, Wang D, Liu Y, Wang J, Shen H, Xu W, Xu H. HMGB1 Facilitated Macrophage Reprogramming towards a Proinflammatory M1-like Phenotype in Experimental Autoimmune Myocarditis Development. *Sci Rep.* 2016 Feb 22;6:21884. PMID: 26899795 PMCID: PMC4761996 DOI: 10.1038/srep21884
- 6) Tian S, Zhang L, Tang J, Guo X, Dong K, Chen SY. HMGB1 exacerbates renal tubulointerstitial fibrosis through facilitating M1 macrophage phenotype at the early stage of obstructive injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015 Jan 1;308(1):F69-75. PMID: 25377911 PMCID: PMC4281691 DOI: 10.1152/ajprenal.00484.2014
- 7) Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmon NL, Lupu F, Esmon CT. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med.* 2009 Nov;15(11):1318-21. doi: 10.1038/nm.2053. Epub 2009 Oct 25. PMID: 19855397
- 8) Miao EA1, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, Warren SE, Wewers MD, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol.* 2010 Dec;11(12):1136-42. PMID: 21057511 PMCID: PMC3058225 DOI: 10.1038/ni.1960
- 9) Allam R, Scherbaum CR, Darisipudi MN, Mulay SR, Hägele H, Lichtnekert J, Hagemann JH, Rupanagudi KV, Ryu M, Schwarzenberger C, Hohenstein B, Hugo C, Uhl B, Reichel CA, Krombach F, Monestier M, Liapis H, Moreth K, Schaefer L, Anders HJ. Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4. *J Am Soc Nephrol.* 2012 Aug;23(8):1375-88. PMID: 22677551 PMCID: PMC3402284 DOI: 10.1681/ASN.2011111077